



**ARDRA para la identificación de las bacterias coliformes
Citrobacter sedlakii y *Citrobacter gilleni*,
del humedal “Laguna de Tierra Blanca” Soacha, Cundinamarca**

Laura Becerra

Universidad Jorge Tadeo Lozano

Viviana Puentes

Universidad Jorge Tadeo Lozano

Julio Martínez

Universidad Jorge Tadeo Lozano

Javier Hernández Fernández

Universidad Jorge Tadeo Lozano

javier.hernandez@utadeo.edu.co

Resumen

Muestras de agua del humedal “Laguna de Tierra Blanca” de Soacha, Cundinamarca, fueron sembradas en agar MacConkey y EMB. Una colonia verde metálico, catalasa positiva y oxidasa negativa se resembró de nuevo en agar EMB y fue sometida a la prueba bioquímica API E20. Se extrajo el DNA, se amplificó el gen 16S rRNA por PCR y se cortó con las endonucleasas de restricción *AluI* y *HpyCH4III*. Un análisis de ARDRA *in silico* fue realizado para 11 secuencias del gen 16S rRNA de todas las especies del género, reportadas en GenBank. El sistema API E20 reveló la presencia de *Citrobacter* sp. El análisis de ARDRA mostró que el patrón de bandas generado por *HpyCH4III* no presentó ninguna coincidencia con los reportados en GenBank. *AluI* presentó seis bandas con tamaños de 592, 338, 368, 227, 95, 92 y 49 pb, coincidiendo con las bandas *in silico* reportadas para las especies *Citrobacter sedlakii* y *Citrobacter gilleni*, presentándose para cada especie bacteriana una banda adicional. La banda de 367 pb identificó a *C. gilleni* y la de 338 pb a *C. sedlakii*, concluyéndose que la colonia aislada contenía posiblemente estas dos cepas bacterianas.

Palabras clave: ARDRA, *Citrobacter gilleni*, *Citrobacter sedlakii*, endonucleasas, *in silico*.

Abstract

Water samples from the wetland "Laguna de Tierra Blanca" Soacha-Cundinamarca were isolated in MacConkey agar and EMB. A metallic green, catalase positive, and oxidase negative colony was reisolated again in EMB agar. The colony was subjected to biochemical test API E20. DNA was extracted, amplified 16S rRNA gene by PCR and cut with restriction endonucleases *AluI* and *HpyCH4III*. An *in silico* ARDRA analysis was performed to 11 sequences of 16S rRNA genes from all species of the genus reported in GenBank. The API E20 system revealed the presence of *Citrobacter* sp. ARDRA analysis showed that the banding pattern generated by *HpyCH4III* made no agreement with those reported in GenBank. *AluI* showed 6 bands with sizes of 592, 338, 368, 227, 95, 92 and 49 bp, coinciding with the *in silico* bands reported for *Citrobacter* species and *C. sedlakii* and *C. gillanii*, for each bacterial species presenting an additional band. The band of 367 bp identified *C. gillanii* and 338 bp of a *C. sedlakii*, concluding that the single colony may contain these two bacterial strains.

Keywords: ARDRA, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter gillanii*, endonucleases, *in silico*.

Índice temático

[Introducción](#)

[Materiales y métodos](#)

[Resultados](#)

[Discusión](#)

[Agradecimientos](#)

[Referencias](#)

OPCION: CLICK DIRECTO A CADA CAPITULO

Introducción

Los humedales de Soacha, Cundinamarca son ecosistemas de gran importancia y su existencia es vital para preservar las especies y mantener el equilibrio del medio ambiente. Estos cuerpos de agua presentan la capacidad de amortiguar las inundaciones en tiempos lluviosos o de

guardar el agua durante los tiempos de sequía, y además son aprovechados por un gran número de especies de flora y fauna como hábitat permanente o como sitio de anidación (CAR, 2011).

Debido al acelerado proceso urbanístico que se ha venido presentando en el municipio, el humedal Laguna de Tierra Blanca está siendo sometido a una fuerte presión (CAR, 2011), que genera un alto grado de contaminación y deterioro ambiental propiciado por el vertimiento de aguas residuales que llegan allí sin ningún tipo de tratamiento. Esto contribuye a la aparición de bacterias coliformes, dentro de las cuales se encuentran los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.

Las bacterias del género *Citrobacter* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos y anaerobios facultativos que exhiben reacciones catalasa-positiva y oxidasa-negativa (Paradis *et al.*, 2005). En adición, ciertas características fenotípicas como la motilidad, la capacidad para tomar el citrato como fuente de carbono y la producción de H₂S, se han considerado elementos clave en su diagnosis y determinación hasta el nivel de especie (Brenner *et al.*, 1999; Janda *et al.*, 1994).

A pesar de que las pruebas bioquímicas son ampliamente usadas para la identificación bacteriana, este tipo de metodología de reconocimiento fenotípico tradicional basado en el comportamiento metabólico, es un método costoso y difícil, que requiere de mayor tiempo, y que no todas las veces produce resultados concluyentes (Drancourt *et al.*, 2000; Paradis *et al.*, 2005). Por esta razón en este estudio se realizó adicionalmente la identificación molecular basada en la técnica ARDRA.

ARDRA (del inglés, *Amplified rDNA Restriction Analysis*) es una herramienta adecuada para diferenciar los productos de PCR sobre la base de la digestión con enzimas. Los perfiles electroforéticos obtenidos pueden ser utilizados para identificar especies, siempre y cuando se cuente con el número y tipo adecuado de enzimas de restricción (Malik *et al.*, 2008; Sklarz *et al.*, 2009). Esta técnica se basa en la digestión del gen ribosomal 16S previamente amplificado mediante la PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) con lo cual el producto obtenido se separa mediante electroforesis en gel de agarosa para una identificación adecuada (Malik *et al.*, 2008). La identificación se lleva a cabo comparando los perfiles de bandas experimentales con los obtenidos mediante análisis *in silico* evitando que especies diferentes exhibieran perfiles similares como lo mencionan Chovanová *et al.* (2004). Algunas de las ventajas que resultan del empleo de esta

técnica, radican en su simplicidad, rapidez, rentabilidad y efectividad en estudios de identificación microbiana, cuando se trabaja con una sola secuencia y cuando existen aproximaciones con respecto a su identidad, por ejemplo, mediante el uso de pruebas bioquímicas (Malik *et al.*, 2008). El presente estudio tuvo como meta la identificación bioquímica y molecular de una colonia bacteriana, utilizando el método ARDRA, haciendo uso de endonucleasas de restricción que permitieron obtener patrones de banda definidos para todas las especies dentro del género estudiado. Cabe anotar que el género *Citrobacter* es un indicador de contaminación fecal oral que incluso puede llegar a asociarse a casos de importancia clínica (Dyer *et al.*, 1997; Paradis *et al.*, 2005), por lo que su aislamiento a partir de una muestra de agua proveniente del humedal Laguna de Tierra Blanca en Soacha podría dar indicios del estado de deterioro que presenta este cuerpo de agua.

Materiales y métodos

Obtención de la muestra: del humedal Laguna de Tierra Blanca, ubicado en el municipio de Soacha (4° 30' – 4° 48' latitud norte, y los 73° 42' – 73° 53' longitud oeste), se obtuvo una muestra de agua y se almacenó en un frasco estéril herméticamente sellado a temperatura ambiente. La muestra fue llevada de inmediato al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano para proceder con los análisis de identificación.

Aislamiento de la cepa: Un inóculo de 10 ml de muestra de agua homogenizada fue sembrado en un medio de cultivo enriquecido *Tryptic Soy Broth* (TSB), y se incubó a 30°C por 48 horas. 0,1 ml de esta siembra fue adicionada sobre agar MacConkey y se incubó a 37°C durante 48 horas (al cabo de las cuales se obtuvo crecimiento). Una colonia de color rojo fue marcada al indicar fermentación láctica, y sobre esta se procedió a tomar un inóculo para resembrar por agotamiento en agar EMB e incubar a 37°C durante 48 horas. Como producto de ello, se obtuvieron colonias aisladas con un color verde-metálico característico de cepas fermentadoras de lactosa (*Citrobacter*, *Escherichia*, entre otras). De modo que, para procurar obtener una cepa pura, se marcó de nuevo una colonia aislada y se volvió a resembrar en agar EMB.

Determinación bioquímica: Se marcó una colonia procedente del último aislamiento para llevar a cabo la identificación. Sobre un inóculo de dicha cepa fue adicionado peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para confirmar la presencia de la enzima catalasa, y se llevó a cabo la prueba de la oxidasa

utilizando el reactivo de Kovacs (solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina), para descartar la presencia de la enzima citocromo C. Posteriormente, se empleó la prueba bioquímica API E20 (*Biomerieux Industry*) con el fin de realizar la identificación de la cepa para género.

Extracción del DNA y PCR: El ADN fue aislado siguiendo un protocolo previamente reportado (Sambrook y Russell, 2001). El ADN, se reveló después de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml). El gel se fotografió empleando el fotodocumentador *UVP GelDoc-It™ System* y se analizó con el programa *VisionWorks LS Image Acquisition and Analysis Software* (UVP, Upland, E.U). Seguidamente, se determinó la concentración y pureza del ADN con el equipo *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* y se registró con el programa *ND-1000 v3.7.1* (Thermoscientific, Denver, EE. UU.). La reacción de PCR se realizó en un termociclador *PTC-100™ Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Madison, EE. UU.) en un volumen final de 25 µl. La reacción por PCR del gen 16s rRNA, incluyó, 1 X tampón de PCR (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8.8 a 25°C], 0,1% Tween-20, Bioline, E.U), 0,5 µM de los oligonucleótidos universales (diseñados sobre secuencias de *Escherichia coli*) (López *et al.*, 2003) 6f (CAGGCCTAACACATGCAACGTC) y WBAC2 (CCCGGGAACGTATTCACCGCG). La mezcla de reacción incluyó 200 µM de dNTPs, 2,5 unidades de *Taq* polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂ y 7 ng de DNA. El programa de termociclado inició con una denaturación a 95°C por cinco minutos, 30 ciclos de 92°C (1 min), 63°C (1,5 min) y 72°C (1 min), y una etapa de extensión final de diez minutos a 72°C.

Para la determinación de la calidad de los productos de PCR se mezclaron 2 µl del producto amplificado por PCR con 2 µl de solución tampón de carga. Esta solución se sirvió en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Se realizó la electroforesis con TBE 0.5X a 100V y se verificó la amplificación del gen 16S rRNA al observar una banda de ~1.500 pb correspondiente a la muestra. Fue comparada con el marcador de peso molecular *Hyperladder II* (Bioline Inc., California, EE.UU.) y analizadas con el programa *VisionWorks LS* (aplicación 1D Analysis plugin). El registro fotográfico se realizó con el fotodocumentador *UVP GelDoc-It™ System* (UVP, Upland, EE.UU.).

Análisis de fragmentos de restricción de la amplificación del gen 16S rRNA: Se realizó un análisis *in silico* con las enzimas de restricción *HpyCH4III* y *AluI*, utilizando una secuencia del gen 16S rRNA disponible en GenBank para cada especie del género *Citrobacter* allí reportada

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Se utilizó el programa NEBCUTTER v.2.0 (Vincze *et al.*, 2003) que permite cortar con enzimas de restricción específicas una región de ADN conocida y predecir el corrido electroforético mostrando un perfil de bandas diferencial. Este perfil *in silico* fue utilizado para realizar comparaciones con el perfil experimental.

A los productos de amplificación del gen 16S rRNA obtenidos experimentalmente por PCR se les realizó una restricción enzimática con las enzimas *HpyCH4III* y *AluI*, de acuerdo con el protocolo propuesto por la casa comercial fabricante (Fermentas Inc., Maryland, EE. UU.). Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% para registrar el patrón de bandas obtenido con el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System y el programa VisionWorks LS (aplicación 1D Analysis plugin). Seguidamente, se comparó la información *in silico* con los patrones obtenidos *in vitro*, teniendo en cuenta el número de bandas generadas y el peso de las mismas.

Finalmente, fue empleado el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 para generar un dendograma semejante, usando los patrones de banda obtenidos *in silico* y experimentalmente. El análisis siguió el método Ward con una distancia métrica euclidiana cuadrada.

Resultados

Aislamiento de la cepa y determinación bioquímica

Se aisló una colonia fermentadora de lactosa a 37°C en 48 horas con producción de ácido y gas (coliforme), y con un brillo verde metálico característico de algunas cepas de los géneros *Citrobacter* y *Escherichia* al ser sembrada sobre agar EMB. Esta colonia fue negativa para la prueba de la oxidasa que evalúa la presencia de la enzima Citocromo c, en tanto que la prueba catalasa resultó ser positiva. En adición, el aislamiento fue sometido a la prueba bioquímica API 20E, siendo identificado el aislamiento como *Citrobacter freundii* con un 95% de certeza.

Extracción del DNA, PCR y análisis de los fragmentos de restricción

Se hizo la extracción del genoma bacteriano, obteniéndose una banda de DNA nítida con otros remanentes celulares tal y como se muestra en la figura 1A. Este producto de extracción fue utilizado para ejecutar la amplificación por PCR del gen 16S rRNA.

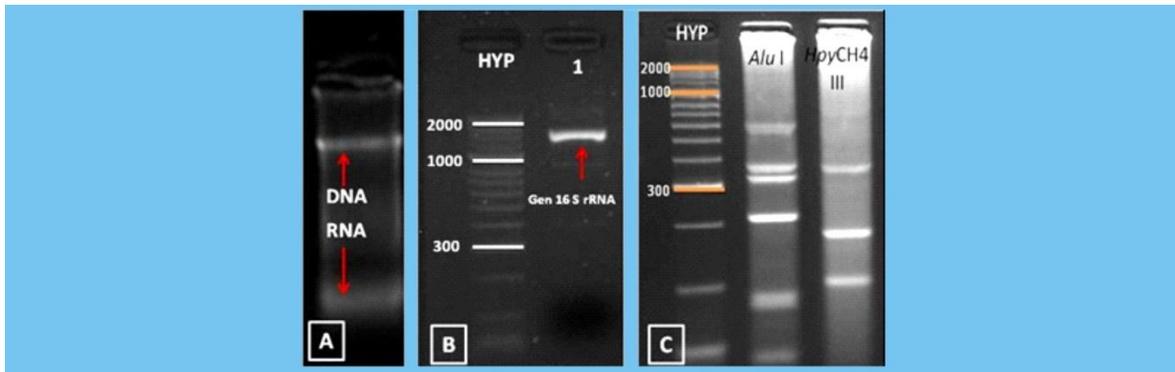


Figura 1. Electroforesis en gels de agarosa. A. DNA cromosómico aislado de la cepa desconocida del género *Citrobacter* sp. Se observa el DNA (banda superior), además de bandas diferenciadas de RNA que quedaron luego del proceso de extracción. B. Producto de amplificación por PCR del gen 16S rRNA de la cepa aislada del género *Citrobacter* sp. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y C. Fragmentos de restricción obtenidos a partir del uso de las endonucleasas *AluI* y *HpyCH4III*, para el producto de amplificación de 1.500 pb del gen 16S rRNA de la cepa aislada del género *Citrobacter* sp. Se presentan siete bandas entre 600 y 50 pb para la restricción con la enzima *AluI* y cuatro bandas entre 640 y 113 pb para la enzima *HpyCH4III*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. HYP: Marcador de peso, Hyperladder II

El producto de amplificación de la región 16S rRNA, se observa en la figura 1B como una banda definida de aproximadamente 1500 pb. Se produjeron algunas bandas inespecíficas durante este proceso, por lo que la banda del gen 16S se cortó del gel y se limpió utilizando un *kit* comercial. Posteriormente, con este producto de amplificación, se ejecutó la restricción enzimática mediante el uso de las endonucleasas *AluI* y *HpyCH4III*. En la figura 1C, se muestran las bandas obtenidas después de la restricción, cuyos pesos moleculares fueron determinados conforme se observa en la tabla 1. Por último, dichos patrones de banda fueron comparados con los obtenidos mediante los análisis *in silico* que muestran las secuencias registradas en la base de datos Gen Bank para un solo individuo de cada especie reportada dentro del género *Citrobacter* (figura 2).

BANDAS	<i>AluI</i>	<i>HpyCH4III</i>
1	592,23	639,8
2	367,94	357,84
3	338,46	184,94
4	227,01	113,08
5	95,08	
6	92,13	
7	49,37	

Tabla 1. Número de bandas y tamaño de cada fragmento de restricción de acuerdo con los cortes realizados con las enzimas *AluI* y *HpyCH4III* del producto de amplificación (1.500 pb) del gen 16S rRNA de la muestra analizada.

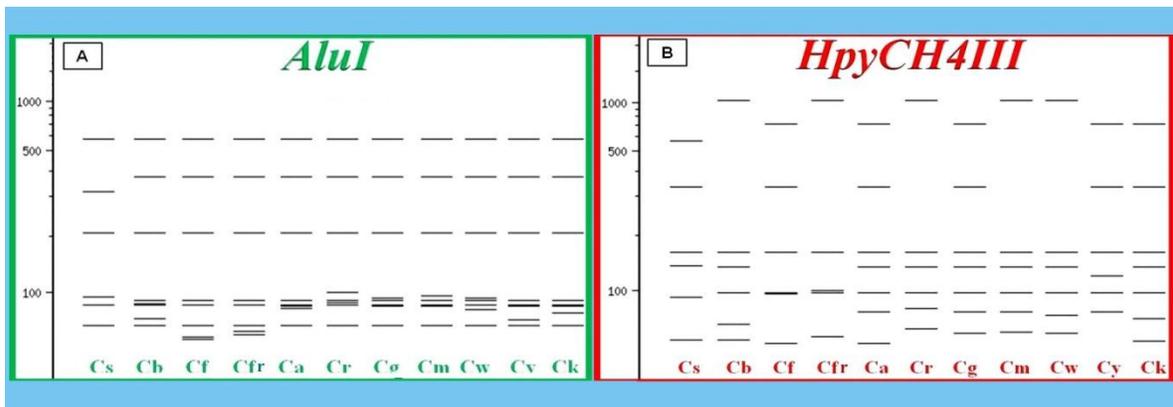


Figura 2. Perfil electroforético de restricción *in silico* para las especies de *Citrobacter* sp., mediante cortes con las endonucleasas de restricción A) *AluI* y B) *HpyCH4III*. Las siglas corresponden a las especies: Cs: *Citrobacter sedlakii*, Cb: *Citrobacter braakii*, Cf: *Citrobacter farmeri*, Cfr: *Citrobacter freundii*, Ca: *Citrobacter amalonaticus*, Cr: *Citrobacter rodentium*, Cg: *Citrobacter gilleni*, Cm: *Citrobacter murlinae*, Cw: *Citrobacter werkmanii*, Cy: *Citrobacter youngae*, Ck: *Citrobacter koseri*.

El perfil electroforético que produjo la endonucleasa *HpyCH4III* al cortar el gen 16S rRNA no mostró ninguna coincidencia al ser comparado con los perfiles *in silico* (figuras1C y 2B). En cambio, el perfil obtenido con la endonucleasa *AluI* coincidió con el patrón de bandas *in silico* reportado para las especies *Citrobacter sedlakii* y *Citrobacter gilleni*, presentándose en cada caso una banda adicional (figuras1C, 2A y 3). La banda de 367 pb se encuentra próxima a la segunda banda obtenida en la figura 3 para *C. gilleni*, en tanto, que la banda con un tamaño de 338 pb (banda 3) parece corresponder a *C. sedlakii*.

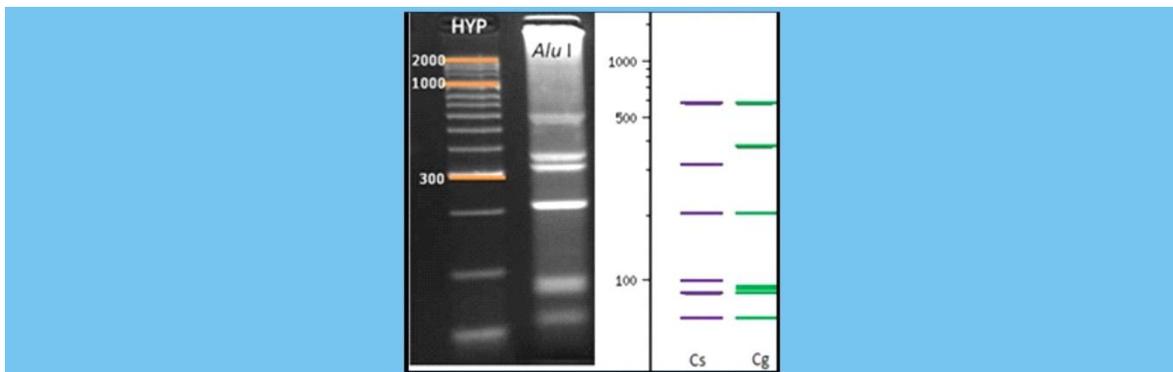


Figura 3. Comparación de la restricción experimental con la enzima *AluI*, con la obtenida a partir de las herramientas bioinformáticas (*restriction enzyme database*) para *Citrobacter sedlakii* (Cs) (violeta) y *Citrobacter gilleni* (Cg) (verde).

Por otro lado, el dendograma de similaridad mostrado en la figura 4 soporta la comparación realizada con anterioridad en relación con *C. gilleni*, al mostrar la cepa problema como grupo

hermano de un clado conformado por esta especie y *C. werkmanii*. No obstante, el número y disposición de bandas detectado para la cepa problema fue diferente al generado por *C. werkmanii* en el análisis *in silico* (figura 2), de modo que no se consideró su inclusión dentro de dicho taxón. En adición, la aparición de una banda distintiva de 338 pb permite concluir que la colonia aislada pertenece a la especie *C. sedlakii*, dado que dicha banda solo es generada por ella y no puede observarse en ningún otro perfil (figura 2). Cabe anotar que tal afirmación podría corroborarse al observar su proximidad con respecto a la cepa problema en el dendograma de similitud (figura 4).

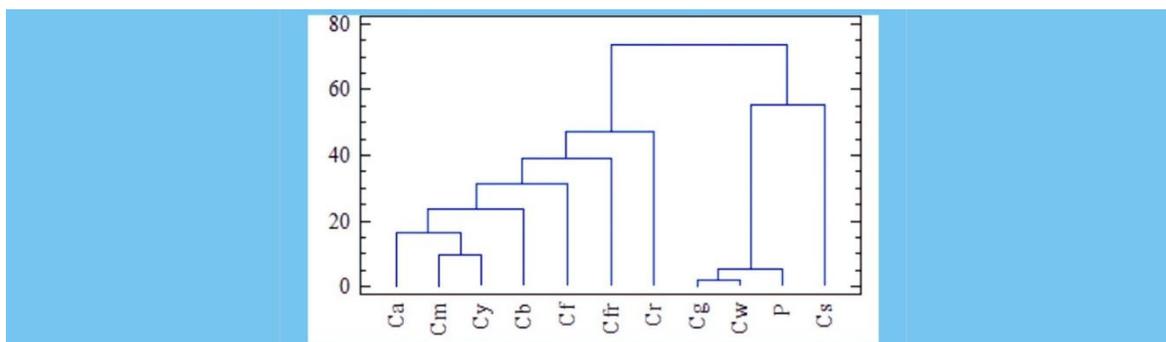


Figura 4. Dendrograma de similitud realizado mediante el método Ward con una distancia métrica euclidiana cuadrada. Las siglas corresponden a las especies: Cs: *Citrobacter sedlakii*, Cb: *Citrobacter braakii*, Cf: *Citrobacter farmeri*, Cfr: *Citrobacter freundii*, Ca: *Citrobacter amalonaticus*, Cr: *Citrobacter rodentium*, Cg: *Citrobacter gillenii*, Cm: *Citrobacter murlinae*, Cw: *Citrobacter werkmanii*, Cy: *Citrobacter youngae*, Ck: *Citrobacter koseri* y P: cepa problema.

Discusión

Dado que la identificación precisa de los aislamientos microbianos es una tarea indispensable en los laboratorios de microbiología clínica y ambiental, la dificultad e inexactitud de los métodos bioquímicos convencionales (Drancourt *et al.*, 2000) puso en evidencia la pertinencia de las pruebas moleculares y de la bioinformática para conocer la identidad del aislamiento. Estas últimas proporcionaron información útil para la determinación de una colonia perteneciente al género *Citrobacter*, cuyas especies no se ajustan a los perfiles bioquímicos de los sistemas comerciales para la determinación de estos organismos (Park *et al.*, 1998). Cabe anotar que el sistema comercial API E20, solo identifica cinco de las 11 especies del género *Citrobacter* reportadas en las base de datos de GenBank, entre las cuales se encuentran *C. braakii*, *C. freundii*, *C. koseri/amalonaticus*, *C.*

koseri/farmerii y *C. youngae* (Juillet, 1999). Por tal motivo, resulta evidente la ineficacia del método para la determinación del aislamiento evaluado.

El genoma bacteriano supone la base fundamental para llevar a cabo la determinación del aislamiento hasta el nivel de especie, y de este modo, el producto final del protocolo de extracción fue suficiente para lograr la amplificación del gen 16S rRNA pese al grado de impureza de la banda obtenida sobre el gel de agarosa (figura 1A). Esto porque el procedimiento de extracción omite el paso descrito en diversos protocolos como el descrito por Velasco (2005), con respecto a la eliminación del RNA. De acuerdo con Velasco (2005), el grado de pureza de la muestra depende del método de purificación y del manejo que se le dé al DNA, pues en un producto de extracción es común encontrar fragmentos de otros componentes celulares. Pese a ello, la amplificación del gen 16S rRNA fue realizada con éxito, obteniéndose una banda en gel de agarosa con un tamaño aproximado de 1.500 pb como se observa en la figura 1B y con la cual se hicieron los posteriores análisis enzimáticos.

La utilización del gen 16S rRNA para la determinación de los aislamientos que no se ajustaron a los perfiles bioquímicos reportados, se llevó a cabo debido a que este gen se presenta en casi todas las bacterias, su tamaño es adecuado para diversos usos en la bioinformática y, en especial, por presentar bajas tasas de cambio que han sido útiles para medir eventos de evolución (Janda y Abbott, 2007). Adicionalmente, y con respecto a los análisis de restricción enzimática sobre el gen 16S rRNA, se ha demostrado que estos pueden ser utilizados para determinar especies de diversos géneros (Deng *et al.*, 1992; Tian *et al.*, 2009; Vanechoutte *et al.*, 1993).

En consecuencia, se emplearon las endonucleasas de restricción tipo II que catalizan la hidrólisis del DNA en sitios específicos (*AluI* y *HpyCH4III*) con la presunción de obtener patrones de banda característicos (*fingerprintings*), como se observó en la figura 1C. No obstante, la figura 1C muestra que el patrón de bandas generado por la enzima *HpyCH4III* no coincidió con ninguno de los observados en el análisis *in silico* para las 11 especies evaluadas dentro de este género. Por otro lado, la endonucleasa *AluI* permitió obtener un patrón de bandas más o menos diferenciado que muestra similitudes sustanciales con respecto a los reportados *in silico* para las especies *C. gillenii* y *C. sedlakii*.

Dado que son pocos los estudios que recurren al método del análisis de restricción para la determinación del género *Citrobacter*, es de suma importancia estandarizar la metodología del

análisis de restricción en pro de mejorar la resolución del gel, con el fin de obtener resultados concluyentes que permitan realizar la determinación hasta el nivel de especie. La resolución del gel posibilita evidenciar la presencia de bandas características tanto de *C. gillanii* (banda 2 de 367 pb) como de *C. sedlakii* (banda 3 de 338 pb), por lo cual se propone la hipótesis de que la colonia bacteriana aislada contenía ambas cepas. Según Gich *et al.* (2000), la divergencia del patrón de restricción del rRNA en un gel está fuertemente influenciada por el tipo de endonucleasas utilizadas, de modo que en el presente estudio se procuró hacer uso de aquellas que proporcionaran un nivel de diferenciación satisfactorio para llegar hasta el taxón especie. No obstante, emplear un número mayor de endonucleasas mostraría una restricción definida para corroborar dicha hipótesis.

Los estudios de Brenner *et al.* (1999) han demostrado que algunas especies del género *Citrobacter* (*C. koseri*, *C. farmerii* y *C. youngae*, entre otras) se encuentran en el ambiente, aunque dicho reporte no existe para el caso de la especie *C. sedlakii*, al estar más asociada con la microbiota humana. Además, los aislamientos del género estudiado son frecuentes en la orina, esputo y tejido blando de algunos especímenes de sangre caliente (Dyer *et al.*, 1997), por lo que su presencia puede ser explicada debido a la presión urbanística sobre la ronda del humedal, y con probabilidad, por las labores de pastoreo que han sido observadas por habitantes del sector.

Finalmente, es de suma importancia resaltar la patogenicidad que le ha sido atribuida al género respecto a diversas enfermedades de importancia clínica, tales como la septicemia, la ventriculitis y la meningitis neonatal con abscesos cerebrales (Dyer *et al.*, 1997; Janda *et al.*, 1994). Sin duda alguna, el aislamiento e identificación de una bacteria coliforme indicadora de contaminación y patógena oportunista frecuente en el humano, pone en evidencia el vertimiento ilegal de aguas residuales sobre este cuerpo de agua y deja entrever las falencias de las entidades ambientales con respecto al manejo y cuidado que deben conferirse a este tipo de ecosistemas. Es por esto que se hace necesario estudiar con detalle el estado actual de deterioro del humedal y fortalecer las legislaciones para la conservación de este cuerpo de agua que tanta importancia tiene en la ecología de las especies que lo habitan.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la profesora Natalia Comba por su apoyo en el aislamiento de las bacterias y los análisis bioquímicos realizados.

Referencias

- BRENNER, D., O'HARA, C., GRIMONT, P., JANDA, J., FALSEN, E., ALDOVA, E., AGERON, E., SCHINDLER, J., ABBOTT, S., y STEIGERWALT, A. 1999. «Biochemical Identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 11)». En: *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (8), pp. 2619-2624.
- CHOVANOVÁ, K., SLÁDEKOVÁ, D., KMEŤ, V., PROKŠOVÁ, M., HARICHOVÁ, J., PUŠKÁROVÁ, A., POLEK, B., y FERIANC, P. 2004. «Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge». En: *Biología, Bratislava*, 59 (6), pp. 817-827.
- CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL, CAR. 2011. «Los humedales de Soacha». Disponible en: <http://humedalneuta.blogspot.com/2010/08/los-humedales-de-soacha-son.html>
- DENG, S., HIRUKI, C., ROBERTSON, J., y STEMKE, G. 1992. «Detection by PCR and differentiation by Restriction fragment length polymorphism of *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, based upon 16s rRNA genes». En: *PCR Methods Applications*, 1, pp. 202-204.
- DRANCOURT, M., BOLLET, C., CARLIOZ, A., MARTELIN, R., GAYRAL, J., y RAOULT, D. 2000. «16s ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates». En: *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (10), pp. 3623-3630.
- DYER, J., HAYANI, K., y JANDA, W. 1997. «*Citrobacter sedlakii* meningitis and brain abscess in a premature infant». En: *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (10), pp. 2686-2688.
- GICH, F., AMER, E., FIGUERAS, J., ABELLA, C., BALAGUER, M., y POCH, M. 2000. «Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)». En: *Int Microbiol*, 3, pp.103-6.
- JANDA, M., ABBOTT, S., CHEUNG, W., y HANSON, D. 1994. «Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory». En: *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (8), pp.1850-1854.
- JUILLET. 1999. *Analytical profile index (api 20 E)* (5ª ed.). París, Biomerieux S. A.
- LÓPEZ, I., RUIZ LARREA, F., COCOLIN, L., ORR, E., PHISTER, T., MARSHALL, M., VANDERGHEYNST, J., y MILLS, D. 2003. «Design and evaluation of pcr primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis». En: *Appl Environ Microbiol*, 69 (11), pp. 6801-6807.
- MALIK, S., BEER, M., MEGHARAJ, M., y NAIDU, R. 2008. «Review article: The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water». En: *Environment International*, 34, pp. 265-276.

PARADIS, S., BOISSINOT, M., PAQUETTE, N. D., BE´LANGER, D., MARTEL, E., BOUDREAU, D., PICARD, F., OUELLETTE, M., ROY, P., y BERGERON, M. 2005. «Phylogeny of the enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase b-subunit». En: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp. 2013-2025.

PARK, C., MARTIN, E., y WHITE, E. 1998. «Isolation of a nonpathogenic strain of *Citrobacter sedlakii* which expresses *Escherichia coli* O157 antigen». En: *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (5), pp. 1408-1409.

SKLARZ, M., ANGEL, R., GILLOR, R., y SOARES, M. 2009. «Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities». En: *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, pp. 659-664.

TIAN, F., DING, Y., ZHU, H., YAO, L., y DU, B. 2009. «Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere». En: *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, pp. 276-284.

VANEECHOUTTE, M., BEENHOUWER, H., CLAEYS, G., VERSCHRAEGEN, G., DE ROUCK, A., PAEPE, N., ELAICHOUNI, A., y PORTAELS, F. 1993. «Identification of *Mycobacterium* species with amplified rDNA restriction analysis». En: *Journal of Clinical Microbiology*, 31, pp. 2061-2065.

VELASCO, R. 2005. «Marcadores moleculares y la extracción de ADN». En: *Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol. 3 (1), pp. 14-18.